

# 东太平洋深海沉积物中 DNA 的提取及细菌多样性初步分析

李友训<sup>1,2</sup>, 李富超<sup>1</sup>, 秦松<sup>1</sup>, 曾志刚<sup>1</sup>, 秦蕴珊<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**以东太平洋海隆附近深海柱状沉积物为材料, 通过化学裂解和酶消化相结合的方法提取了沉积物微生物的总基因组 DNA, 并进行了纯化。结果表明所得到的 DNA 分子片段大小在 21 kb 左右, 纯化后的 DNA 可直接用于 PCR 等分子生物学操作。细菌 16S rDNA V3 可变区的 PCR-DGGE 图谱展示出 15 条以上条带, 表明深海沉积物中细菌多样性较高, 群落结构比较复杂。对其中 9 条主要条带进行回收、测序和系统发育分析, 结果表明所获得的序列分属放线菌门 (Actinobacteria), 绿弯菌门 (Chloroflexi),  $\gamma$ -变形细菌亚门 (Gammaproteobacteria),  $\alpha$ -变形细菌亚门 (Alphaproteobacteria) 和嗜酸菌门 (Acidobacteria) 5 个大类群。

**关键词:** 深海沉积物; DNA; DGGE

**中图分类号:** Q93

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3096(2008)12-0069-06

近年来, 随着分子生物学方法在环境微生物研究中的广泛应用, 该领域的研究突破了对传统培养方法的依赖<sup>[1]</sup>, 在微生物群落、多样性、生态学以及生物地球化学研究等方面都取得了很大进展<sup>[2-5]</sup>。

对环境微生物在群落水平上进行研究的分子生物学方法主要包括 DGGE、SSCP、克隆文库、TRFLP 以及 Realtime PCR 等, 这些方法都是建立在对 DNA 进行研究的基础上的。深海是目前人类活动很少达到的极端环境, 深海沉积物样品相对比较难获得, 同时其中生物量相对较少, 和陆地环境相比具有更为复杂和独特的化学成分, 如腐殖酸、重金属等, 这些都给提取高质量的深海沉积物 DNA, 进行环境微生物研究造成了困难。近年来, 国内外对深海沉积物 DNA 提取方法的报道很多<sup>[6-11]</sup>, 比较通用的方法往往是密度梯度离心和商业化的试剂盒, 这些方法往往对设备有特殊的要求, 并且成本较高。本实验以来自东太平洋热液喷口附近沉积物为研究对象, 通过参考和借鉴文献报道的方法, 结合本实验室的条件, 改进出一套简单有效的深海沉积物 DNA 提取方法, 并通过 PCR-DGGE 对该沉积物中的细菌多样性进行了快速分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 沉积物样品

沉积物样品由中国科学院海洋研究所海洋地质与环境重点实验室提供。采样地点: 站点 E271 位于东太平洋海隆北纬 12°~13°, 深度为 3 191 m。

#### 1.1.2 主要试剂和引物

dNTP 和 *Taq* 酶购于美国 Promega 公司, DNA

产物纯化试剂盒购于天根生化科技有限公司, 16S rDNA V3 可变区引物<sup>[12]</sup> (341F: 5-GCCTACGGGAGGCA GCA G3, 341F-GC: 5-CGCCCGCCGCGCGGC GGGC GGGGCGGGGAC GGGGGGCC TACGGGA GGCA GCA G3 和 534R: 5-ATTACCGCGGCTGCTGG3) 由上海生工生物技术有限公司合成。其他试剂均为国产试剂。

### 1.2 沉积物样品的处理和 DNA 的提取

针对本实验样品的特殊性, 根据已报道的沉积物 DNA 提取技术<sup>[8,9,11,13]</sup> 结合本实验室的条件加以改进。

取 2 g (湿质量) 沉积物样品装入 1.5 mL 离心管中, 于 4℃ 融化过夜。待样品完全融化后 14 000 g, 4℃ 离心 10 min, 弃上清。将沉淀转入 15 mL 离心管中, 加入 4 mL 裂解缓冲液 (3% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 100 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 2% 巯基乙醇, 1% PVP), 用研磨杵将沉淀研磨均匀, 旋涡震荡仪剧烈震荡, 尽量使沉积物悬浮于裂解缓冲液中。加入蛋白酶 K 至终质量浓度 200  $\mu$ g/mL, 37℃ 水浴 48 h。期间每 12 h 补充 1 次蛋白酶 K (同样至终质量浓度 200  $\mu$ g/mL)。

蛋白酶消化后, 将管中的液体部分分装到 4 个 1.5 mL 离心管, 12 000 g, 4℃ 离心 10 min 后取上清,

收稿日期: 2008-04-12; 修回日期: 2008-11-20

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目 (2007-1, KZCX3-SW-223, KSCX-2-YW-G-022); 中国大洋协会项目 (DYXM-115-02-2-17)

作者简介: 李友训 (1976-), 男, 山东青州人, 博士, 研究方向: 微生物分子生态学, E-mail: youxunli@yahoo.com.cn; 秦松, 通讯作者, sqin@ms.qdio.ac.cn

在上清中加入 RNase 至终质量浓度 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 于 60  $^{\circ}\text{C}$  消化 30 min, 加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提, 12 000 g, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min。将水相转入新的离心管中, 然后用等体积的氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提, 12 000 g, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min, 重复氯仿/异戊醇抽提两次。取上清加入 1/10 体积 3 mol/L 的醋酸钠和预冷的 2 倍体积无水乙醇, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  沉淀过夜。12 000 g, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min, 弃去上清, 用 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀两次, 干燥沉淀物。用 pH 8.0 的 TE 缓冲液 50  $\mu\text{L}$  溶解核酸沉淀。

### 1.3 沉积物总基因组 DNA 的检测和纯化

沉积物总 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以 DNA *EcoR* V *Hind*III 双酶切 Marker 作为标准分子质量 DNA, EB 染色后在紫外凝胶成像系统中观察, 拍照。使用天根生化科技有限公司的产物纯化试剂盒进行纯化。

### 1.4 沉积物中细菌 16S rDNA V3 片段的 PCR 扩增

PCR 体系: 灭菌 Mili Q 水 12.8  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR 缓冲液 (不含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  1.6  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 引物各 1  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 1 U, 10 mmol/L dNTP 0.4  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增 16S rDNA V3 片段的反应条件参照文献 [12] 进行。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并将 16S rDNA V3 可变区约为 200 bp 的条带割下来, 用天根生化科技有限公司的胶回收试剂盒回收。

### 1.5 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

应用 Bio-Rad Universal Mutation Detection System 进行 PCR 产物的多态性分析。使用 8% 的丙烯酰胺凝胶, 电泳缓冲液为 1  $\times$  TAE, 变性梯度为 40% ~ 80%, 取 40  $\mu\text{L}$  纯化的 PCR 产物上样。电压 65 V, 60 min, 时间 10 h。SYBR-GOLD 染色, 蓝盾可见光投射仪拍照。

### 1.6 细菌 16S rDNA 序列的测定

从 DGGE 凝胶上小心切下不同位置的条带, 转入无菌 1.5 mL 离心管中, 加入 200  $\mu\text{L}$  无菌水冲洗 3 次, 50  $\mu\text{L}$  无菌水 4  $^{\circ}\text{C}$  浸泡过夜后以上清为模板, 引物 341F (不含 GC-clamp) / 534R 进行 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增 [12]。

上述 V3 区 PCR 产物经过纯化连接到载体 pMD18-T 克隆载体 (Takara, 大连), 转化到 *Escherichia coli* Top 10 感受态细胞, 在含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 筛选具有氨苄青霉素抗性的白色转化子。采用 pMD18-T 载体通用引物 M13-47 和 Rv-M 进行菌落 PCR, 然后使用阳性菌落的 PCR 产物作为模板, 使用通用引物 341F-GC 和 534R, 进行二次 DGGE, 选择与第一

次 DGGE 条带在同一位置的克隆送国家人类基因组南方中心测序, 测序引物为 M13-47 和 Rv-M, 将得到的序列提交到 GenBank。

### 1.7 系统发育分析

使用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 将测序获得的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中进行搜索, 获得与每条序列相似性最高的序列。使用 CLUSTALW 工具进行序列比对 [14], 获得了长度 190 bp 左右的同源序列。应用 MEGA3.1 软件中的邻位相接法进行系统发育分析 [15]。

## 2 结果

### 2.1 DNA 提取、纯化和细菌 16S rDNA V3 区序列的扩增

琼脂糖凝胶电泳检测显示所提取的 DNA 在 21 kb 左右有一条主带 (图 1)。经过适当稀释 (本实验中稀释倍数为 50 倍), 通过细菌特异性引物进行 PCR 扩增得到 16S rDNA V3 区序列, 扩增所产生的 DNA 片段为单一条带, 片段大小约为 200 bp (图 2), 表明扩增产物无非特异性扩增现象。DNA 产物经过纯化以后可以直接进行细菌 16S rDNA V3 可变区的扩增, 在 200 bp 左右有一条主带 (图 2)。

### 2.2 DGGE 结果及分析

DGGE 图谱显示出 15 条不同位置的带, 其中有 9 条带型比较亮 (图 3)。说明该沉积物中生存的细菌种类比较多。将这 9 条主带进行回收、克隆、测序, 所得到的序列大小在 169 ~ 196 bp 范围内。序列已提交至 GenBank 核酸数据库, 序列号为 EU258612- EU258620 (表 1)。

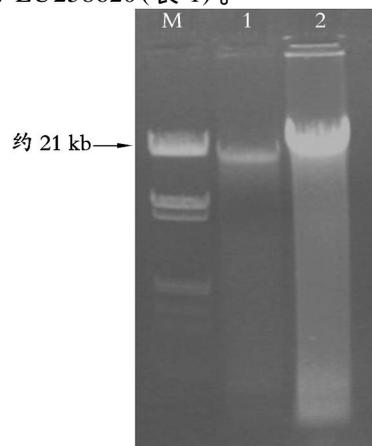


图 1 东太平洋海隆 E271 站点表层沉积物总 DNA 的提取和纯化

Fig. 1 Total DNA extraction and purification from the surface sediment of station E271 at East Pacific Rise

M: DNA *EcoR* V *Hind* 双酶切 Marker; 1: 纯化后的 DNA; 2: 纯化前的 DNA

M: DNA *EcoR* V *Hind* digest Marker; 1: Purified DNA; 2: DNA before purification

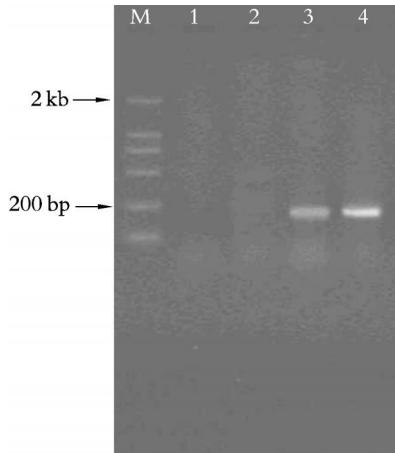


图2 16S rDNA V3 片段扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of bacterial 16S rDNA V3 fragments

M:DL2000 marker;1:空白对照;2:未处理前DNA 扩增结果;3:稀释 50 倍以后的扩增结果;4:纯化以后的扩增结果

M: DL2000 marker;1: Negative contrast; 2: PCR with raw DNA as template; 3: PCR with raw DNA after diluted at 1/50 as template; 4: PCR with purified DNA as template



图3 东太平洋海隆 E271 站点表层沉积物中细菌群落的 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE fringer printing of the bacterial community inhabiting the surface sediment of station 271 at the East Pacific Rise

表 1 通过 PCR-DGGE 获得的 16S rDNA V3 可变区序列

Tab. 1 Overview of the bacterial 16S rDNA fragments obtained in this study

序列号	亲缘最近的克隆及其序列号	相似度 (%)	条带位置
EU258612	Uncultured bacterium clone Napoli-1B-52 (A Y592607)	99	1
EU258617	Uncultured bacterium clone E7 (AM411562)	100	2
EU258613	Uncultured bacterium clone 6mML2 G08 (EF630321)	100	3
EU258620	Uncultured bacterium clone P13-83 (EU287176)	100	4
EU258619	Uncultured bacterium clone Toolik_Jun2005_shruborg_74 (DQ509967)	93	5
EU258615	Uncultured bacterium clone MD2902-B142 (EU385993)	98	6
EU258618	Uncultured alpha <i>Proteobacterium</i> clone HCM3MC83_9B_FF (EU373868)	100	7
EU258616	Uncultured bacterium clone EP4-07 (EF491505)	99	8
EU258614	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone ESB2 (EF061216)	99	9

### 2.3 系统发育分析

通过用 BLAST 与 GenBank 数据库中的序列比较分析表明本实验中所获得的序列与数据库中 16S rDNA 序列的相似性在 93% ~ 100% 之间(表 1)。与本研究所有 9 条序列亲缘最近的序列均来自于海洋或者海洋沉积物环境。系统发育分析表明本研

究所获得的 9 条序列分别属于放线菌门(Actinobacteria, 3 条序列),绿弯菌门(Chloroflexi, 2 条), -变形细菌亚门(Gamma-proteobacteria, 2 条),嗜酸菌门(Acidobacteria, 1 条)和 -变形细菌亚门(Alpha-proteobacteria, 1 条)等 5 个大类群。

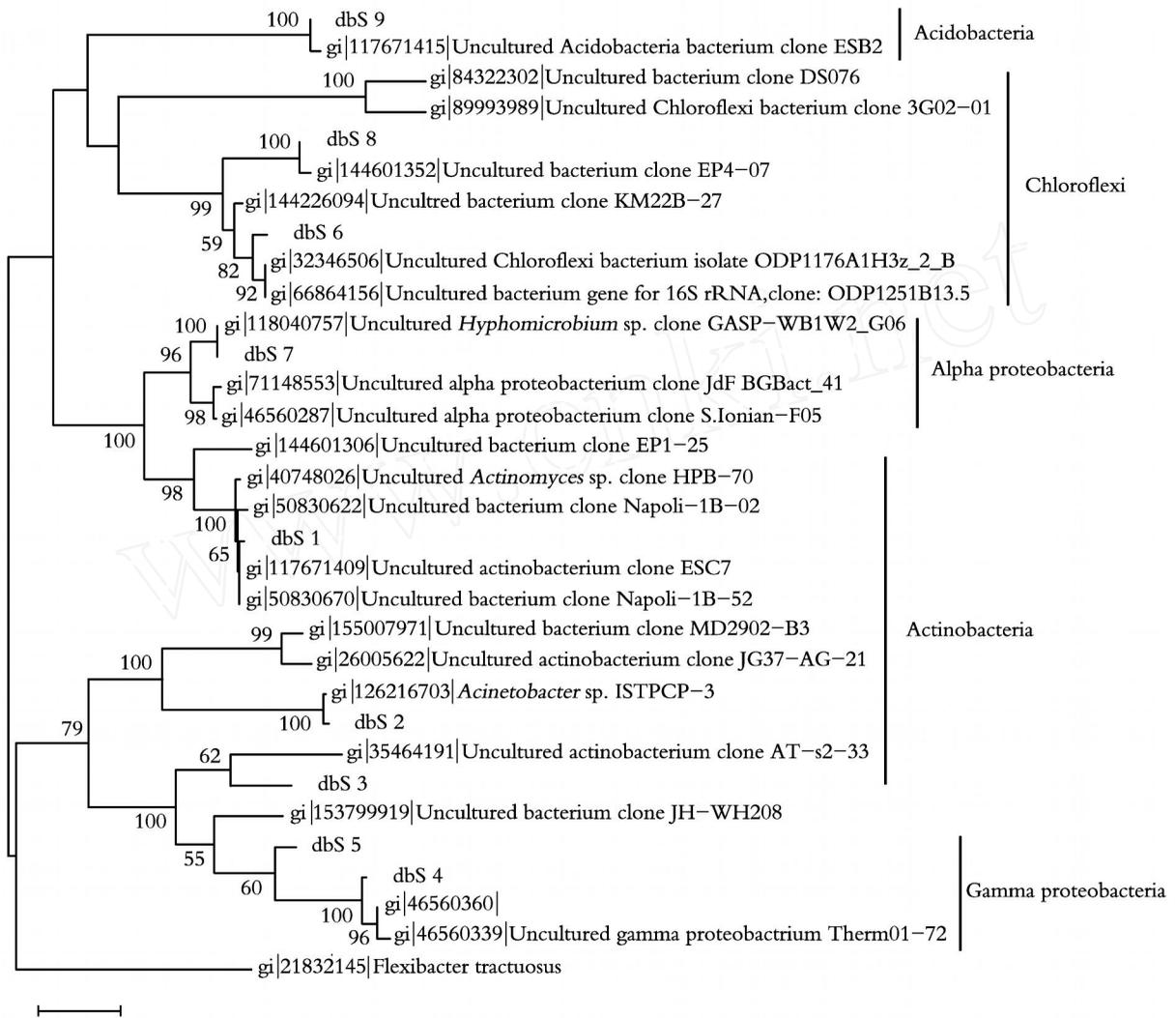


图 4 东太平洋海隆 E271 站点表层沉积物中优势细菌种群的系统发育分析(只显示 50%的 Bootstrap 值)

Fig. 4 Phylogenetic analysis of the dominant bacterial groups inhabiting the surface of station 271 at the East Pacific Rise (Bootstrap values 50% were eliminated from the branches)

### 3 讨论

#### 3.1 DNA 的提取和纯化

克隆文库、DGGE、TRFLP 等分子生物学方法可以摆脱对培养条件的依赖,迅速有效地对微生物群落进行研究。但是这些方法都是建立在对 DNA 进行分析基础上的。本实验所采用的 DNA 提取方法,通过延长消化时间来降低重金属等因素对细胞裂解过程的影响,最终确定了 48 h 左右作为最佳裂解时间,所获得的 DNA 条带比较集中,再经过国产试剂盒纯化可以降低产物中腐殖物质的残留。纯化的产物作为模板可获得单一的 PCR 产物条带。同文献中所报道的方法相比,本方法采用的全都是常规试剂,对设备没有特殊要求,成本较以前报道的相

关方法要低很多,而且步骤比较简化,虽然 DNA 经过试剂盒纯化后产物得率明显降低,但足以满足依赖于 PCR 的各种分子生物学实验的需要,适合在本实验室大规模展开研究。同时本实验中所获得的 DNA 质量也通过后续的多多样性分析得到了验证,PCR 产物经过 DGGE 分离、条带切割、序列测定和系统发育分析,初步揭示了东太平洋深海沉积物中具有较高的细菌多样性。

#### 3.2 深海沉积物中的微生物多样性

变性梯度凝胶电泳(DGGE)是目前研究微生物多样性的一种较成熟的方法,可用来对环境样本中的微生物多样性进行定性和半定量分析。一般情况下认为在 DGGE 胶上不同位置的条带代表不同的 DNA 序列,通过进一步实验获得序列以及后续的序

列分析可以对环境微生物群落的组成和结构进行快速鉴定。DGGE 带型分析表明本实验所研究的沉积物中具有较高的细菌多样性。条带的数目和亮度的差异可以在一定程度上表明不同细菌类群在整个群落中占有不同的比例。回收测序的 9 条主要条带也属于不同的类群,这表明深海沉积物细菌群落中优势种群的组成较复杂。

各种类型的变形细菌是深海沉积物中微生物群落的重要组成部分<sup>[16]</sup>。国内外许多研究表明其在太平洋深海沉积物的生物地球化学过程中扮演着重要角色,比如不同类型的变形细菌在硫元素循环中同时参与氧化和还原两种作用<sup>[3]</sup>。本实验中所得的结果也表明变形细菌是该沉积物中变形细菌的优势种群。绿弯菌门是 20 多年以前才被认可的一个新的系统发育分支<sup>[17]</sup>。在现有条件下,这一类群很难培养,所以其生理生化特性和功能目前还没有报道。但是在以前的某些研究中表明,绿弯菌主要生活在深海和一些湖泊中,被认为在厌氧环境中起着目前所未知的重要作用。与本实验结果中绿弯菌 16S rDNA 序列亲缘关系最近的克隆分别来自南海和东太平洋深海沉积物环境,与本研究样品的取样环境相似。放线菌是一种个体微小但是在海洋环境中广泛存在的微生物类群,被认为在海洋环境中发挥着非常重要的作用<sup>[18]</sup>。在本实验中,放线菌的比例非常高,这与科学家们在南开海槽(Nankai Trough)进行的研究非常相似<sup>[19]</sup>。这可能意味着放线菌在深海环境特别是海沟或者海槽微生物群体中扮演着不可或缺的角色,但是其具体作用还有待于进一步研究。另外,酸杆菌也是一类广泛分布的微生物,在陆地海洋的各种环境中都经常被发现。其遗传多样性和代谢多样性从一个侧面证明其可能存在多种多样的功能<sup>[20]</sup>。与本实验中发现的酸杆菌序列亲缘关系最近的序列来自于东太平洋锰结核地区和地中海氧化层沉积物<sup>[21]</sup>,也表明这类酸杆菌广泛地分布于深海沉积物环境。

本实验所采用的方法是建立在对沉积物样品直接进行化学裂解和酶消化基础上,利用传统的酚仿抽提法来获得 DNA,再使用廉价的国产试剂盒进行纯化,所获得的 DNA 片段在 21 kb 左右。由于消化条件的限制可能对某些微生物种群基因组的提取效率不高。同时也由于 DGGE 的检测范围限制,只能对群落中的优势种群进行快速鉴定。在今后的工作中,本实验室将在大规模开展 16S rDNA 等分子标记研究的同时把本文所述的消化方法和脉冲场电泳(PFGE)等技术结合起来,争取获得大片段 DNA,构建基因组文库以进一步研究该沉积物中微生物的群

体结构和功能。

致谢:中国科学院海洋研究所生态室肖天研究员和刘敏博士在 DGGE 过程中提供了很大帮助和支持,在此表示感谢。

#### 参考文献:

- [1] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180: 4 765-4 774.
- [2] Massana R, Murray A E, Preston C M, *et al.* Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 50-60.
- [3] Nercessian O, Fouquet Y, Pierre C, *et al.* Diversity of Bacteria and Archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge [J]. *Environ Microbiol*, 2005, 7: 698-714.
- [4] Fang J, Shizuka A, Kato C, *et al.* Microbial diversity of cold-seep sediments in Sagami Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene and lipid analyses [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, 57: 429-441.
- [5] Lehours A C, Evans P, Bardot C, *et al.* Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in the anoxic zone of a meromictic lake (Lake Pavin, France) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 2 016-2 019.
- [6] Roose-Amsaleg C L, Garnier-Sillam E, Harry M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples [J]. *Appl Soil Ecol*, 2001, 18: 47-60.
- [7] Maarit Niemi R, Heiskanen I, Wallenius K, *et al.* Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia [J]. *J Microbiol Meth*, 2001, 45: 155-165.
- [8] Juniper S K, Cambon M A, Lesongeur F, *et al.* Extraction and purification of DNA from organic rich subsurface sediments (ODP Leg 169S) [J]. *Mar Geol*, 2001, 174: 241-247.
- [9] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, *et al.* Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 4 715-24.
- [10] Rochelle P A, Fry J C, Parkes R J, *et al.* DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 79: 59-65.
- [11] Leff L G, Dana J R, McArthur J V, *et al.* Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 1 141-1 143.

- [12] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1993, 59: 695-700.
- [13] Zhao J, Zhang R, Lin N, *et al.* Small-scale DNA extraction from deep-sea sediment and application [J]. **Oceanologia et Limnologia Sinica**, 2003, 34:313-321.
- [14] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. **Nucleic Acids Res**, 1994, 22: 4 673-4 680.
- [15] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [J]. **Brief Bioinform**, 2004, 5: 150-163.
- [16] Uthicke S, McGuire K. Bacterial communities in Great Barrier Reef calcareous sediments: Contrasting 16S rDNA libraries from nearshore and outer shelf reefs [J]. **Estuar Coast Shelf S**, 2007, 72: 188-200.
- [17] Woese C R. Bacterial evolution [J]. **Microbiol Rev**, 1987, 51: 221-271.
- [18] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea [J]. **Science**, 2004, 304: 66-74.
- [19] Colwell F, Matsumoto R, Reed D. A review of the gas hydrates, geology, and biology of the Nankai Trough [J]. **Chem Geol**, 2004, 205: 391-404.
- [20] Wise M G, McArthur J V, Shimkets L J. Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1997, 63: 1 505-1 514.
- [21] Polymenakou P, Bertilsson S, Tselepidis A, *et al.* Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a Comparison of Four 16S Ribosomal DNA clone libraries [J]. **Microb Ecol**, 2005, 50: 447-462.

## DNA extraction and DGGE analysis of the bacterial community of a deep-sea sediment sample collected at the East Pacific Ocean

LI You-xun<sup>1,2</sup>, LI Fu-chao<sup>1</sup>, QIN Song<sup>1</sup>, ZENG Zhi-gang<sup>1</sup>, QIN Yun-shan<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received**: Apr. 12, 2008

**Key words**: deep-sea sediment; DNA; DGGE

**Abstract**: The total genomic DNA of a deep-sea sediment sample collected at the East Pacific Ocean was extracted using a combined chemical and protease-lysis method. The size of DNA was about 21 kb, and could be used directly for PCR-based molecular research after purification. PCR-DGGE profile of bacterial 16S rDNA V3 fragments gave rise to more than 15 bands. Blast analysis revealed that most of the retrieved sequences from DGGE bands were closely related to uncultured clones from various marine sediment environments, and the dominant groups were Actinobacteria, Chloroflexi, Gamma-proteobacteria, Alpha-proteobacteria and Acidobacteria.

(本文编辑:张培新)